Journal of Health

Vol. 12, No. 3, Autumn 2021, Pages 340-348

Determination of Keratinase Enzyme Activity by *Bacillus megatrium* SKH14 Strain

Khodayari S[1], Kafilzadeh F* [2]

1. MSc, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. Professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
**** Corresponging author.*** Tel: +989171140799, E-mail: kafilzadeh@jia.ac.ir

Received: May 28, 2019 Accepted: Jun 30, 2020

ABSTRACT

Background & objectives*:* Billions of chickens are consumed annually in the world and about billions of tons of chicken feathers are produced. About 5 to 7 percent of the chicken's weight is feather and about 90 percent of the feathers are keratin. Feather is a pure keratin protein that is highly insoluble and difficult to break down. Some bacteria have the ability to produce the keratinase enzyme to break down keratin. The aim of this study was to determine the factors affecting the growth of SKH14-isolated *bacilli megatrium* strain SKH14 and to measure the enzymatic activity of keratinase.

Methods: Soil samples were collected in sterile plastic containers. Seven bacterial isolates were grown on a specific environment, of which 5 showed clear decomposition and were selected for biochemical tests, 16S rRNA sequencing and keratin measurement activity. These five bacteria were then sequenced and GeneBank accession number was assigned for each of them as a new strain. Five bacteria were tested for keratinase production and the strongest strain was optimized for keratinase production.

Results: Five isolates were belonged to different strains of bacilli, and all five isolates were feather decomposer at different times. The highest enzymatic activity was reported in *Bacillus megaterium* SKH14 with 18.01 units per ml and the lowest in *Bacillus felexus* SKH4 with 10.81 units per ml.

Conclusion: The complete decomposition of *Bacillus megaterium* SKH14 isolate showed that this bacterium has high protease activity and is able to decompose complete keratin.

Keywords: Keratinase Enzyme; *Bacillus megaterium*; Keratin; Feather

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]

[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]

[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

تعیین فعالیت آنزیم کراتیناز توسط باکتری *باسیلوس مگاتریوم* سویه جدید SKH14

سمیه خدایاری[1]، فرشید کفیل زاده[2]*

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۷۱۱٤۰۷۹۹ ایمیل: kafilzadeh@jia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در جهان سالانه میلیاردها عدد مرغ مصرف می‌شود و میلیاردها تُن، پَر مرغ تولید می‌گردد. حدود ۵ تا ۷ درصد وزن مرغ را پَر و حدود ۹۰ درصد از پَر را کراتین تشکیل می‌دهد. پَر، پروتئین خالصی از کراتین است که بسیار نامحلول و سخت تجزیه است. برخی از باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم کراتیناز برای تجزیه کراتین را دارند. این مطالعه با هدف تعیین عوامل موثر بر رشد باکتری باسیلوس مگاتریوم سویه SKH14 جداسازی شده از خاک و اندازه گیری فعالیت آنزیمی کراتیناز انجام شد.

روش کار: نمونه های خاک در ظروف استریل پلاستیکی جمع آوری گردید. تعداد ۷ ایزوله باکتریایی بر روی محیط اختصاصی پَر رشد کرده که از این تعداد، ۵ ایزوله تجزیه واضحی را نشان دادند و برای تست‌های بیوشیمیایی و توالی 16S rRNA و اندازه‌گیری فعالیت کراتینازی انتخاب گردیدند. سپس این ۵ باکتری تعیین توالی گردیدند و Accession در بانک ژنی برای هر کدام از آنها با عنوان سویه‌ای جدید تعیین شد. ۵ باکتری از نظر میزان تولید آنزیم کراتیناز مورد بررسی قرار گرفت و قوی ترین سویه از نظر تولید آنزیم کراتیناز بهینه سازی گردید.

یافته‌ها: تعداد ۵ ایزوله متعلق به سویه‌های مختلفی از باسیلوس‌ها بودند که هر ۵ ایزوله، تجزیه کننده پَر، در زمان‌های متفاوت بودند. بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به باکتری *Bacillus megaterium* SKH14 با میزان ۱۸/۰۱ واحد بر میلی لیتر در دقیقه و کمترین میزان مربوط به باکتری *Bacillus felexus* SKH4 با میزان ۱۰/۸۱ واحد بر میلی لیتر در دقیقه گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: تجزیه پَر بوسیله ایزوله *Bacillus megaterium* SKH14 نشان داد که این باکتری قدرت پروتئازی زیادی دارد و قادر به تجزیه کراتین کامل است.

واژه های کلیدی: آنزیم کراتیناز، *باسیلوس مگاتریوم*، کراتین، پَر

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷ **پذیرش:** ۱۳۹۹/٤/۱۰

مقدمه

مو، پَر، ناخن، پشم، منقار و شاخ حاوی مقادیر بالایی از کراتین هستند (۱, ۲). کراتین پروتئینی نامحلول و بسیار پایدار است. ترکیبات و ساختار مولکولی این پروتئین عامل استحکام ساختمانی آن می‌باشد (۳). کراتین‌ها با توجه به محتوای سولفور به دو دسته کراتین‌های نرم و کراتین‌های سخت گروه‌بندی می‌شوند (٤). کراتین سخت در بخش‌هایی مانند پَر، مو، سُم و ناخن وجود دارد که دارای مقدار زیادی باندهای دی سولفیدی قوی و در شرایط عادی

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

غیرقابل‌تجزیه است (٤). کراتین نرم در بافت‌های پوست و پینه وجود دارد که حاوی میزان کمتری باندهای دی سولفیدی است و در نتیجه انعطاف‌پذیری بیشتری دارد (٤). پَر مرغ پروتئینی از جنس کراتین است که بسیار سخت تجزیه و نامحلول است (۵). حدود ۵ تا ۷ درصد وزن مرغ را پَر و حدود ۹۰ درصد از پَر را کراتین تشکیل می‌دهد (۷،۶). در جهان سالانه میلیاردها عدد مرغ مصرف می‌شود و حدود ۸/۵ میلیارد تن، پَر مرغ تولید می‌گردد (۸). محتوای بالای پروتئین در زباله‌های حاوی کراتین می‌تواند به یک منبع خوب پروتئینی و آمینو اسیدی با استفاه از سیستم چرخه بازیافت شود (۲). بازیافت پَر می‌تواند ماده غذایی پروتئینی متناوب و ارزانی را فراهم آورد که این ماده غذایی می‌تواند به عنوان خوراک پرندگان و بسیاری پروسه‌های دیگر استفاده شود. از گذشته تا کنون با استفاده از دما و فشار بالا توسط تیمار حرارتی و شیمیایی، کراتین را به راحتی متابولیزه می‌کنند و این همزمان است با از دست دادن چند اسید آمینه ضروری از قبیل متیونین، لیزین و تریپتوفان که ارزش غذایی کراتین را پایین می‌آورد. بنابراین تیمار حرارتی و شیمیایی به‌اندازه کافی محتوای تغذیه‌ای پودر پَر را نگاه نمی‌دارد (۹،۱۰). از این رو شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تولید آنزیم تجزیه‌کننده کراتین (کراتیناز) را دارند حائز اهمیت می‌باشد.

کراتینازها دسته‌ای خاص از پروتئازها هستند که قادرند پلی پپتید بسیار سخت و محکم کراتین را بشکنند (٤). تعدادی از قارچ‌ها و باکتری‌ها توانایی تولید کراتیناز در حضور سوبسترای کراتین را دارند که با تولید این آنزیم، کراتین موجود در پَر، مو، ناخن و پشم را تجزیه می‌کنند (۶). کراتیناز باکتریایی با دارابودن پتانسیل بالا برای هیدرولیز کراتین در روش‌های بیوتکنولوژی، مورد توجه است (۱۱).

در میان باکتری‌ها، باکتری گرم مثبت باسیلوس[1] بیشترین قدرت تجزیه‌کنندگی کراتین را دارد (٤). در دهه‌های اخیر از کراتین هیدرولیزشده توسط باکتری‌ها در صنعت خوراک دام و طیور، کود نیتروژنی، چسب، فیلم و همچنین به عنوان منبعی غنی از اسیدآمینه‌های سرین[2]، سیستئین[3] و پرولین[4] استفاده می‌گردد (۱۲،۱۳). از آنزیم کراتیناز در صنایعی از قبیل مواد شوینده، پزشکی، آرایشی و صنعت چرم نیز استفاده می‌گردد (۱٤،۱۵).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین از خاک زمین‌های اطراف مرغداری‌های شهرستان مرودشت و بررسی عوامل موثر بر رشد و میزان تولید آنزیم کراتیناز در سویه برتر می‌باشد.

روش کار

جمع‌آوری نمونه‌های خاک

در این مطالعه مقطعی توصیفی، نمونه‌های خاک در شهریور ماه ۱۳۹٤ از خاک زمین‌های اطراف مرغداری‌های شهرستان مرودشت از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری سطح خاک در ظروف استریل پلاستیکی برداشته و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی و غربالگری باکتری‌های تولیدکننده کراتیناز- برای غنی سازی

ارلن‌های ۱۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط پایه نمکی مایع[5]؛ کلرید سدیم ۵ گرم بر لیتر، دی‌پتاسیم فسفات ۱ گرم بر لیتر، منو پتاسیم فسفات ۱ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم بر لیتر، سولفات آمونیوم ۱ گرم بر لیتر و پَر سفید مرغ ۱۰ گرم بر لیتر، به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، با ۵ گرم از هر نمونه خاک به مدت ۷ روز در دمای اتاق

[1] *Bacillus*
[2] Serine
[3] Cysteine
[4] Proline
[5] Mineral Salt Medium Broth

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

(۳۰- ۲۵ درجه سیلیسیوس) بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد (۶).

پس از ۷ روز از هر کدام از ارلن‌های مذکور بر روی محیط کشت نوترینت آگار (Merck, Germany) کشت داده شد و تا به دست آمدن کلنی خالص چندین بار تکرار گردید (۶).

شناسایی

مرحله شناسایی بر روی محیط کشت اختصاصی انجام گرفت و فقط باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین جداسازی و شناسایی شدند (۱۶). این غنی‌سازی بر روی محیط پایه پَر جامد[1] به همراه پَر خیلی ریزشده (۱ تا ۳ میلی‌متری) به عنوان منبع کربن و نیتروژن انجام گردید، این محیط حاوی تمامی ترکیبات محیط پایه نمکی مایع به اضافه ۱۵ گرم آگار است. از کلنی‌های خالص شده محیط نوترینت آگار، بر روی محیط اختصاصی جامد کشت داده شد. سپس پلیت‌ها مدت ۱تا ۷ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سیلسیوس قرار داده شد. از این میان، ۵ ایزوله که هاله و اندازه بزرگتری داشتند برای شناسایی انتخاب گردیدند (۶).

ژن 16S rRNA بوسیله واکنش زنجیره پلی مراز (PCR)، توسط پرایمرهای یونیورسال زیر گسترش یافت (۱۷):

F(5- AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3)
R(5-GGT TAC CTT GTTACG ACTT-3)

تعیین توالی محصولات PCR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی صورت گرفت. سپس توالی‌ها در بانک ژنی[2] با شماره خاص[3] ثبت گردیدند.

اندازه گیری فعالیت کراتیناز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، به محلول کراتینین-DMSO و آنزیم خالص نیاز است. ۱ میلی لیتر از آنزیم خالص با ۱ میلی‌لیتر از محلول کراتین-DMSO با یکدیگر مخلوط گردید و در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سیلسیوس به‌مدت ۱۰دقیقه قرار داده شد.

سپس حجمی مساوی یعنی ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد نیز اضافه گردید. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، ضریب خاموشی محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر (A280) به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Cary50, Australia) در مقابل کنترل اندازه‌گیری و به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید:

$$U= 4\times n\times A280/(0.01\times 10) \qquad (۶)$$

۰/۰۱: ضریب خاموشی است که کنترل نشان می‌دهد.
n: عدد رقیق سازی. ٤: حجم نهایی بر حسب میلی لیتر.
۱۰: مدت زمان انکوبه‌کردن در بن‌ماری بر حسب دقیقه می‌باشد. واحد فعالیت آنزیم کراتینازی Units/ml/min گزارش می‌گردد.

بر اساس تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با مقدارآنزیمی‌که سبب افزایش ضریب خاموشی ۰/۰۱ بین کنترل و نمونه تحت شرایط یکسان می‌گردد.

از محیط کشت با باکتری بدون سوبسترا (پَر) به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۶).

بررسی شرایط مختلف بر فعالیت آنزیم کراتیناز برای سویه برتر و بهینه سازی شرایط رشد

باکتری در درصدهای مختلف وزنی- حجمی سوبسترا (پَر مرغ) (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۵ و ۲) کشت داده شد و فعالیت آنزیمی در ۵ روز متوالی اندازه‌گیری شد (۶). همچنین باکتری در درصدهای متفاوت وزنی حجمی گلوکز (۰/۵، ۱/۲۵ و ۲/۵) کشت داده و فعالیت آنزیمی در ۵ روز متوالی اندازه‌گیری شد.

لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات فوق، جداگانه ۳ مرتبه در شرایط یکسان تکرار گردید.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-18 و آزمون‌های ANOVA و دانکن[4] در سطح ($p<۰/۰۱$) انجام گرفت.

[1] Agar Based Mineral Salt Medium
[2] Gen Bank
[3] Accission Number
[4] Duncan

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

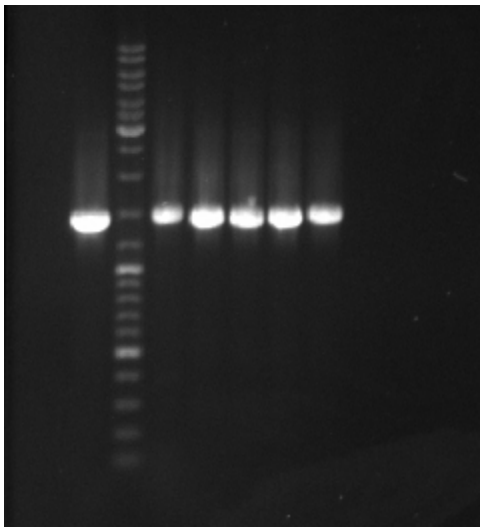
[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

یافته‌ها

از کل نمونه‌های خاک مورد بررسی، ۳۰ باکتری از گونه‌های مختلف باکتریایی پس از غنی‌سازی‌های متوالی اولیه و ثانویه بر روی محیط نوترینت آگار جداسازی گردید. از محیط پایه پَر، ۵ باکتری که تجزیه مناسبی را نشان دادند برای رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، سیترات، هیدرولیز نشاسته، تست V-P، متیل رد، احیای نیترات و تخمیر قندها، انتخاب گردیدند. سپس از روش PCR و 16S rRNA برای شناسایی بیشتر استفاده شد. روش PCR و 16S rRNA یک روش حساس و تخصصی است.

رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی، انجام شد و مشخص گردید که یک ایزوله، باسیلوس مگاتریوم[1]، یک ایزوله باسیلوس تورنجینسیس[2] و سه ایزوله باسیلوس فلکسوس[3] هستند .

محصول PCR به دست آمده جهت بررسی ژن‌ها برای هر باکتری، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد توسط دستگاه ژل داک بررسی شدند و ژن‌های 16S rRNA باندهای مشخص در محدوده 1500 bp (جفت بازی) ایجاد کردند (شکل ۱).



شکل ۱. از چپ به راست +Cont، Ladder، SKH5...SKH14

[1] *Bacillus megaterium*
[2] *Bacillus thuringienesis*
[3] *Bacillus flexus*

نتایج حاصل از توالی یابی در بانک ژنی:
Accission number: KX343199, KX371093, KX371094, KX371095, KX958490
باکتری‌ها تحت عنوان سویه‌های جدید به ثبت رسیدند.

نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیم کراتیناز

فعالیت کراتینازی ۵ سویه باکتریایی بر حسب واحد بر میلی لیتر بر دقیقه (U/ml/min) بر اساس روش ذکرشده، بدست آمد. بیشترین میانگین فعالیت آنزیمی مربوط به باکتری *Bacillus megaterium* SKH14 عدد ۱۸/۰۱ و کمترین میانگین فعالیت آنزیمی مربوط به باکتری *Bacillus flexus* SKH4 با عدد ۱۰/۸۱ بدست آمد. پس از بررسی فعالیت آنزیمی ۵ سویه، اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($p<۰/۰۱$).

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز در شرایط مختلف

از آن جهت که سویه *Bacillus megaterium* SKH14 بیشترین میزان تجزیه را در مدت زمان کمتر با بهترین فعالیت آنزیمی نشان داد برای بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز در شرایط مختلف انتخاب گردید. نتایج حاصل از سه دوره اندازه گیری فعالیت آنزیم با مقادیر مختلف پَر و گلوکز تحت شرایط یکسان طی ۵ روز گزارش گردید. واحد اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کراتیناز Units/ml/min است.

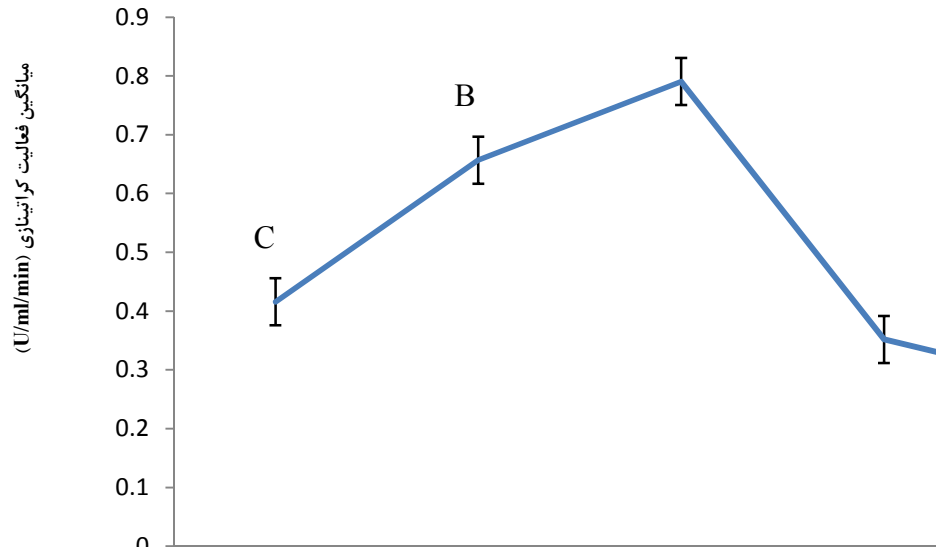
فعالیت آنزیم کراتیناز ۵ سویه با روش فوق اندازه‌گیری شد و به شرح زیر است:

Bacillus megaterium SKH14 Accession: KX958490:18/01
Bacillus flexus SKH4 Accession: KX371094:10/81
Bacillus thuringienesis SKH3 Accession: KX371093: 10/90
Bacillus flexus SKH2 Accession: KX343199 :10/94
Bacillus flexus SKH5 Accession: KX371095 :10/85

مقایسه اثر مقادیر مختلف سوبسترا (پَر) بر تولید آنزیم کراتیناز

نتیجه حاصل از بررسی فعالیت آنزیم در باکتری *Bacillus megaterium* SKH14 نشان داد که این

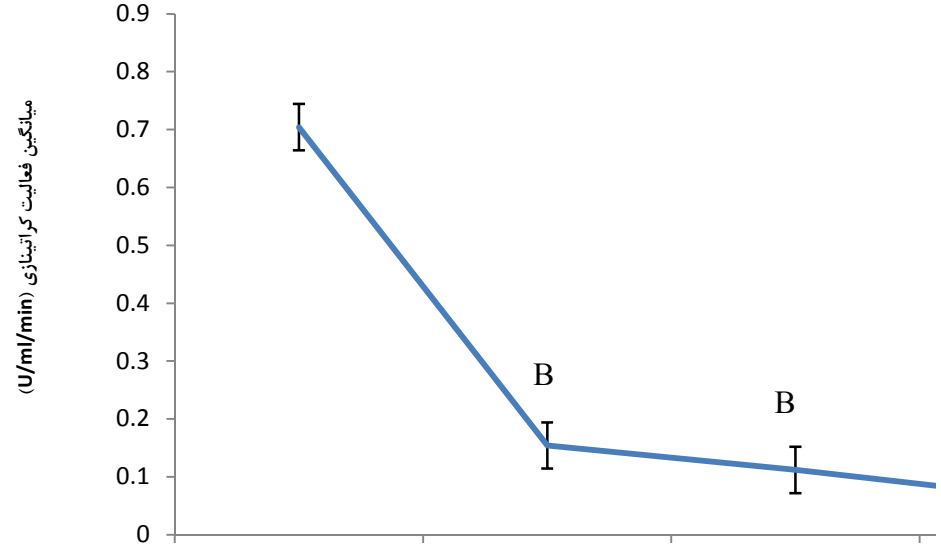
باکتری در مقادیر مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۵ و ۲ درصد پَر، توانایی رشد دارد و همچنین قادر به تولید آنزیم کراتیناز است. مقدار بهینه (اپتیمم) سوبسترا، برای حداکثر تولید آنزیم کراتیناز، ۰/۷۵ درصد تعیین گردید (نمودار ۱). نتایج آنالیز آماری دانکن اختلاف معنی‌داری را بین میانگین‌های فعالیت کراتیناز در مقادیر مختلف پر نشان داد ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۱. مقایسه اثر مقادیر مختلف پَر مرغ بر تولید آنزیم کراتیناز سویه SKH14

مقایسه اثر مقادیر مختلف گلوکز بر تولید آنزیم کراتیناز

نتیجه کلی حاصل از بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز توسط سویه SKH14 نشان داد که این باکتری در مقادیر مختلف گلوکز و همچنین در عدم حضور این قند ساده، قادر به رشد و همچنین تولید آنزیم کراتیناز است. در غیاب گلوکز فعالیت آنزیم حداکثر است ولی با افزایش غلظت گلوکز فعالیت آن به‌شدت کاهش می‌یابد (نمودار ۲). نتایج آنالیز آماری دانکن اختلاف معنی‌داری را بین میانگین‌های فعالیت کراتیناز در غلظت‌های مختلف گلوکز نشان داد ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۲. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف گلوکز بر تولید آنزیم کراتیناز سویه SKH14

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

بحث

باسیلوس‌ها ظرفیت بالایی در تولید آنزیم کراتیناز نسبت به سایر باکتری‌ها دارند (۷). تعداد زیادی از دانشمندان از جمله واینشوارن[1] و همکاران، رادیکا[2] و همکاران، و پاندیان[3] و همکاران، در تحقیقاتی توانستند سویه‌های مختلفی از باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین را از خاک و پسماندهای مرغ جداسازی کنند (۲،۱۸،۱۹).

مازوتو[4] و همکاران، سیواکومار[5] و همکاران، و آگراهاری[6] و همکاران؛ مشابه با تحقیق حاضر، موفق به جداسازی باسیلوس تورنجینسیس و باسیلوس سرئوس با خاصیت تولیدکنندگی کراتیناز از خاک گردیدند (۵،۲۰،۲۱). تا کنون در ایران پژوهشی مشابه با تحقیق جاری که باسیلوس فلکسوس با خاصیت کراتینازی را از خاک جداسازی کرده باشد، انجام نشده است.

از آنجا که کراتین حاوی تعداد زیادی پیوندهای محکم پروتئینی است، تجزیه پَر توسط سویه‌های باسیلوس نشان می‌دهد که این سویه‌ها دارای یک آنزیم پروتئاز (کراتیناز) با توانایی شکستن پیوندهای مذکور هستند. سازگاری این باکتری نسبت شرایط محیطی از دیگر باکتری‌های موجود در خاک بیشتر است. بنابراین سویه‌های باسیلوس بهترین کاندید در صنعت زیست فناوری جهت تولید آنزیم کراتیناز می‌باشند (۲۲).

در پژوهش جاری فعالیت آنزیمی قوی‌ترین سویه از لحاظ تولید کراتیناز، *Bacillus megaterium* SKH14، ۱۸/۰۱ واحد بر میلی لیتر بر دقیقه تعیین شد. نتایج نسبتاً مشابهی در تحقیقات دیگران بدست آمده است، به طوری که مهتا[7] و همکاران فعالیت آنزیمی کراتیناز تولیدشده توسط *باسیلوس لیشنی فورمی*[8] را ۱۴/۳۴۴واحد بر میلی لیتر بر دقیقه و آگراوال[9] و همکاران فعالیت آنزیم کراتیناز سویه‌ای از جنس باسیلوس را ۱۳/۶۰ واحد بر میلی لیتر بر دقیقه گزارش کردند (۱۹،۲۲).

مقدار سوبسترای مورد نیاز (پر مرغ) برای تولید حداکثر آنزیم کراتیناز، ۰/۷۵ درصد تعیین گردید. این یافته با مشاهدات مهتا و همکاران که حداکثر تولید کراتیناز را با مقدار ۰/۷۵ درصد سوبسترا گزارش کردند، هم خوانی دارد (۱۹). پاندیان و همکاران حداکثر فعالیت کراتیناز را برای سویه‌ای از باسیلوس با مقدار ۲ درصد وزنی- حجمی از پَر گزارش کردند (۲). در مطالعه جاری فعالیت کراتیناز در غلظت ۲ درصد وزنی- حجمی سوبسترا بسیار کاهش یافت.

به دلیل اینکه تولید کراتیناز وابسته به حضور کراتین و همچنین میزان کراتین در محیط کشت است، افزایش میزان سوبسترا باعث اشباع سوبسترا (پَر) می‌گردد که این خود باعث کم‌شدن و بی‌کیفیت‌شدن کراتیناز می‌گردد و عامل بازدارنده از فعالیت مناسب این آنزیم می‌گردد (۱۱). در نتیجه با افزایش مقادیر سوبسترا (یعنی ۲ درصد وزنی- حجمی پَر)، فعالیت آنزیمی کاهش یافته و همچنین در مقادیر کم سوبسترا (۰/۲۵٪) نیز به‌دلیل کم‌بودن کراتین قابل دسترس برای باکتری به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد.

مهتا و همکاران نشان دادند که تجزیه پَرها در حضور منبع کربن اضافه گلوکز، کاهش یافت و متعاقباً فعالیت آنزیم کراتیناز نسبت به محیط بدون قند، کاهش چشمگیری یافت. در غیاب یک منبع کربن اضافه، پَرها به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار گرفتند و تولید آنزیم بالا رفت. اما با اضافه‌کردن یک منبع کربن اضافه (قند ساده گلوکز)، باعث جلوگیری از ترشح

[1] Vigneshwaran
[2] Radhika
[3] Pandian
[4] Mazotto
[5] Sivakumar
[6] Agrahari
[7] Mehta
[8] *B.licheniformis*
[9] Agrawal

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

آنزیم کراتیناز نشد. حضور یک منبع کربنی ساده علاوه بر یک منبع پروتئینی سخت مانند کراتین پَر، تولید آنزیم را کاهش می‌دهد زیرا باکتری ابتدا باید منابع غذایی ساده را استفاده کند. در این مورد باکتری ابتدا گلوکز موجود در محیط کشت را به عنوان یک منبع کربنی ساده مورد استفاده قرار می‌دهد (۱۹). در تحقیق حاضر نیز همانگونه که انتظار می‌رود، ایزوله *Bacillus megaterium* SKH14 ماکزیمم تولید آنزیم را زمانی نشان می‌دهد که در محیط کشت، پَر به عنوان تنها منبع کربن وجود داشته باشد. این یافته با نتایجی که مهتا و همکاران برای باکتری با سیلوس سونورنسیس و سیواکومار و همکاران برای باسیلوس تورنجینسیس گزارش کردند مشابه است (۱۹،۲۱). ولی رمنانی[1] و همکاران گزارش کردند که فعالیت آنزیم کراتیناز تولیدشده به وسیله باکتری باسیلوس سابتیلیس[2] در حضور گلوکز افزایش می‌یابد (۲۳). به‌طور کلی در اکثر تحقیقات گلوکز اثرات منفی بر فعالیت پروتئینازهای میکروبی از جمله کراتیناز را نشان داده است (۲۱).

پیشنهاد می‌گردد که بر روی خاک تمام مرغداری‌ها و پسماندهای مرغداری‌ها و همچنین خاک زمین‌های کشاورزی استان فارس و سایر استان‌ها پژوهش‌هایی صورت بگیرد و باکتری‌های مختلف تولیدکننده آنزیم کراتیناز به منظور بهره‌جستن از آنزیم کراتیناز جداسازی گردد.

نتیجه گیری

فعالیت کراتینازی *B.megaterium SKH14* نشان داد که این باکتری قدرت پروتئازی خوبی دارد و می‌تواند کراتین را به خوبی تجزیه کند. سویه SKH14 کاندید مناسبی در صنایع مختلف است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی می‌باشد. بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به‌دلیل حمایت‌های پژوهشی و علمی سپاسگزاری می‌گردد.

[1] Ramnani
[2] *Bacillus subtilis*

References

1- Onifade A, Al-Sane N, Al-Musallam A, Al-Zarban S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresource technology. 1998;66(1):1-11.
2- Pandian S, Sundaram J, Panchatcharam P. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. European Journal of Experimental Biology. 2012;2(1):274-82.
3- Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Archives of Microbiology. 2003;179(4):258-65.
4- Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied microbiology and biotechnology. 2006;70(1):21.
5- Agrahari S, Wadhwa N. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant. International Journal of Poultry Science. 2010;9(5):482-9.
6- Mehta RS, Jholapara RJ, SAWANT CS. Optimization of cultural conditions for extracellular keratinase production by Bacillus species isolated from poultry farm soil. International Journal of Pharma and Biosciences. 2013;4(2):454-63.
7- Mousavi S, Salouti M, Shapoury R, Heidari Z. Optimization of keratinase production for feather degradation by Bacillus subtilis. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013;6(8).

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]

8- Neha S, Alka G, Omre P. Characterization of chicken feather fibre as novel protein fiber for commercial applications. International Journal of Tropical Agriculture. 2015;33(4 (Part III)):3373-7.
9- Wang X, Parsons C. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. Poultry Science. 1997;76(3):491-6.
10- Papadopoulos M, El Boushy A, Roodbeen A, Ketelaars E. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Animal Feed Science and Technology. 1986;14(3-4):279-90.
11-Sahoo DK, Das A, Thatoi H, Mondal KC, Mohapatra PKD. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;167(5):1040-51.
12-Cao Z-J, Zhang Q, Wei D-K, Chen L, Wang J, Zhang X-Q, Zhou M-H. Characterization of a novel Stenotrophomonas isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2009;36(2):181-8.
13-Cai C, Zheng X. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new Bacillus subtilis KD-N2 using response surface methodology. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2009;36(7):875-83.
14-Farag AM, Hassan MA. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae. Enzyme and Microbial Technology. 2004;34(2):85-93.
15-Mazotto AM, Coelho RRR, Cedrola SML, de Lima MF, Couri S, Paraguai de Souza E, Vermelho AB. Keratinase production by three Bacillus spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. Enzyme research. 2011;2011:1-7.
16-Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media; 2011.
17-Femi-Ola T, Akinbobola O, Oluwaniyi T. Isolation and characterization of feather degrading bacteria from poultry soil. Agriculture and Biology Journal of North America. 2015;6(5):146-54.
18-Vigneshwaran C, Shanmugam S, Kumar TS. Screening and characterization of keratinase from Bacillus licheniformis isolated from Namakkal poultry farm. Researcher. 2010;2(4):89-96.
19-Mehta RS, Jholapara RJ, Sawant CS. Isolation of a novel feather-degrading bacterium and optimization of its cultural conditions for enzyme production. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6(1):194-201.
20-Mazotto AM, de Melo ACN, Macrae A, Rosado AS, Peixoto R, Cedrola SM, Couri S, Zingali RB, Villa ALV, Rabinovitch L. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from Bacillus spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2011;27(6):1355-65.
21-Sivakumar T, Shankar T, Vijayabaskar P, Ramasubramanian V. Optimization for keratinase enzyme production using Bacillus thuringiensis TS2. Academic Journal of Plant Sciences. 2012;5(3):102-9.
22-Agrawal B, Dalal M. Screening and characterization of keratinase enzyme obtained from keratin degrading microorganism isolated from Sanjan poultry waste dumping soil. European Academic Research. 2015;2(11):13986-94.
23-Ramnani P, Gupta R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2004; 40: 191-6.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-02-05]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.3.2.7]
[DOI: 10.52547/j.health.12.3.340]